

AISLAMIENTO DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* EN VACAS  
 MESTIZAS HOLSTEIN EN EL MUNICIPIO GIRARDOT  
 DEL ESTADO ARAGUA

Isolation of *Leptospira interrogans* in Crossbred Holstein  
 Cows in Aragua State

Karen C. Clerc P.<sup>\*1</sup>, Liliana Aidorevich de A.<sup>\*\*</sup>,  
Olga Tkachuk S.<sup>\*\*\*</sup> y Nelson Marquez Q.<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Departamento de Sanidad Animal, Cátedra de Medicina Aplicada,  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado.  
4563. Maracay 2101. <sup>\*\*</sup>Instituto de Investigaciones Veterinarias, INIA.  
Laboratorio de Leptospirosis. Maracay, Estado Aragua. <sup>\*\*\*</sup>Cátedra de  
Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central  
de Venezuela. Estado Aragua. Venezuela.

Correo-E: karenclerc@yahoo.com

Recibido: 06/05/02 - Aprobado: 14/10/03

RESUMEN

Con el objeto de aislar *Leptospira interrogans* serovar georgia en vacas mestizas Holstein en el municipio Girardot del estado Aragua, se tomó como área de estudio una finca de ganadería mestiza Holstein que mostraba alta actividad serológica contra el serovar en estudio. Para seleccionar el grupo de estudio, se tomaron 42 vacas en producción láctea y se escogió como muestra aquellas que presentaron anticuerpos con títulos mínimos de 1/100 contra el serovar georgia, a través de la prueba de Microaglutinación (Micro Agglutination Test, MAT), resultando el tamaño de la muestra de 16 vacas. De las 16 vacas se recolectaron muestras de sangre y orina, las cuales fueron sembradas en 3 medios de cultivo selectivos para *Leptospiras* y en 3 diluciones diferentes. Los cultivos se revisaron quincenalmente durante tres meses, tiempo después del

ABSTRACT

In order to isolate *Leptospira interrogans* serovar georgia in crossbred Holstein cows, a farm with a herd showing high serologic activity against serovar georgia in the municipality of Girardot in the state of Aragua were selected as study area. Samples was taken from forty-two milking cows with minimum antibodies titers of 1/100 against serovar georgia as determined by Micro Agglutination Test (MAT). The final sample size was 16 cows. Blood and urine samples were collected from those 16 cows and cultured in 3 *Leptospira* selective culture media of three different dilutions. The cultures were checked every 15 days for 3 months, time frame when growth of the *Leptospira* was observed in 2 of the culture inoculated with urine, at the 10<sup>-1</sup> dilution level in Fletcher culture media. After the isolation, identification began at serogroup level by using the MAT test with 13 hyperimmune

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

cual se observó crecimiento del género *Leptospira* en dos (2) de los medios sembrados a partir de muestras de orina, a la dilución de  $10^{-1}$  y en el medio de cultivo Fletcher. Posterior al aislamiento, se inició la identificación a nivel de serogrupo a través de la prueba de MAT utilizando 13 sueros hiperinmunes de conejo de los serogrupos de *Leptospira* mas conocidos; a nivel de serovar, la identificación se realizó por la prueba de MAT con anticuerpos monoclonales. Los aislados reaccionaron a los sueros hiperinmunes de los serogrupos hardjo, pomona y sejroe, observándose los mayores títulos para el serogrupo sejroe, que es antigénicamente compatible con el serogrupo mini al cual pertenece el serovar georgia. A nivel de serovar, ambos aislados fueron identificados como *Leptospira interrogans* serovar pomona. Con base a estos resultados, se concluyó que los bovinos en estudio estaban infectados por mas de un serovar de *Leptospira interrogans* y que la serología no se correspondió con la bacteriología, lo que indica que la presencia de anticuerpos en suero contra un serovar de *Leptospira* no es indicativo de su presencia en los riñones. Además se especuló que era posible que los bovinos se comporten como hospederos accidentales del serovar georgia.

(Palabras clave: Vacas lecheras, *Leptospira*, serotipos, aislamiento, Aragua).

## INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad infecciosa que afecta al hombre y a casi todas las especies de animales domésticos y silvestres con alta morbilidad y baja mortalidad, causada por uno o varios

rabbit antisera of well known *Leptospira* serogroups. The identification at serovar level, was made by means of MAT test with monoclonal antibodies. The isolates reacted to the serogroups hardjo, pomona and sejroe hyperimmune rabbit antisera; the sejroe serogroup produced the higher titers. At serovar level, both isolates were identified as *Leptospira interrogans* serovar pomona. Based on the results, it was concluded that the cattle studied were infected by more than one serovar of *Leptospira interrogans* and that the serology did not agree with the bacteriology findings, which indicating that the presence of serum antibodies against specific *Leptospira* serovar is not indicative of its presence in the kidneys. From the findings, was discussed the possibility the cattle studied behaved as an accidental hosts of serovar georgia.

(Key words: Dairy cows, *Leptospira*, serotypes, isolation, Aragua).

serovares de *Leptospira interrogans* y ocasiona severos problemas en los animales domésticos, principalmente en los bovinos. Al mismo tiempo, su carácter antropozoonótico constituye un riesgo para la salud pública. Esta enfermedad se caracteriza por producir septicemia, nefritis

intersticial, anemia hemolítica y abortos en la mayoría de los animales y por abortos, mastitis y nacimiento de crías débiles en los bovinos (Contreras 1992).

La vía de penetración al organismo humano o animal, ocurre a través de excoiaciones en la piel o por las membranas mucosas (oral, conjuntival, vaginal o prepucial) y, posiblemente, por la ingestión de agua o alimentos contaminados. La orina de los animales enfermos o portadores latentes que pueden contener millones de organismos por ml., contaminan las aguas superficiales corrientes y estancadas de las áreas endémicas: ríos, arroyos, lagos, lagunas, piscinas, arrozales, cañaverales, etc., constituyendo fuentes de contaminación para el hombre y animales (Merchant y Parcker, 1980; Ellis, 1986; Biberstein y Chung, 1994; Heath y Jonson, 1994; Lugo, 1996). La transmisión también puede ocurrir por la vía transplacentaria o sexual (Hartskeerl *et al.*, 2000).

Las especies de *Leptospira* se agrupan en serogrupos diferentes de acuerdo a su comportamiento antigénico y dentro de cada serogrupo se pueden encontrar diferencias antigénicas denominadas serovares. La técnica de restricción de la Endonucleasa ha permitido dividir "aislados" que antigénicamente eran clasificados como *L. interrogans* serovar hardjo, en dos genotipos o tipos: hardjo-bovis y hardjo-prajitno (Prescott, 1993). Hasta 1994 se habían clasificado 223 serovares organizados en 23 serogrupos de *Leptospira interrogans* (Woodward y Redstone, 1994). Para 1999, nuevos estudios de clasificación de la familia *Leptospiraceae*, logran estructurar 268 serovares en 29 serogrupos y además comienzan a clasificar las especies por genotipos, determinados con base a métodos genéticos, proponiendo así, 5

genotipos diferentes (Brenner *et al.*, 1999). Por otra parte, se han aislado nuevos serovares como *L. fanej*, que no están incluidos en los serogrupos conocidos, por lo que se ha propuesto un nuevo serogrupo denominado Hurstbridge (Perolat *et al.*, 1998). Los serovares de *Leptospira* se asocian a una o varias especies de animales; muchos serovares y muchos hospederos reservorios, cada uno en su nicho ecológico particular, pueden coincidir en un área determinada, favoreciendo la transmisión y epidemiología de la enfermedad en esa área geográfica (Hartskeerl *et al.*, 2000).

El serovar georgia se aisló por primera vez en animales silvestres y posteriormente en el hombre y en perros en algunos países de América Latina (Galton *et al.*, 1960; Everard *et al.*, 1980), y en 1998 en el Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV) de Venezuela, se observó que había actividad serológica en los bovinos y humanos, lo que hace pensar que este serovar está circulando en nuestro ecosistema y se puede haber adaptado a los bovinos, produciendo efectos patológicos en los mismos.

Debido a que el serovar georgia es una cepa de *Leptospira* que ha sido aislada principalmente en humanos (Galton *et al.*, 1960); con base a las amplias evidencias que existen del papel de los animales silvestres en la epidemiología de la leptospirosis (Contreras, 1992); conociendo la estrecha relación que existe entre los animales silvestres y el medio ambiente en el que se desarrollan los bovinos, y debido a la importancia de esta enfermedad en la productividad y actividad reproductiva de dichos animales, es importante determinar si este serovar ha logrado infectar y adaptarse a los bovinos de nuestro país.

El serovar georgia de *Leptospira interrogans* ha sido detectado por pruebas serológicas (Aglutinación Microscópica) en vacas mestizas Holstein en el municipio Girardot del estado Aragua, lo que sugiere que este microorganismo se encuentra presente en rebaños bovinos de esta localidad. Para comprobar esta premisa, se planteó como objetivo específico aislar *Leptospira interrogans* serovar georgia en vacas mestizas Holstein en el municipio Girardot del estado Aragua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio:** El ensayo se realizó en una finca de ganadería de leche, ubicada en la Zona Industrial San Vicente II, en el municipio Girardot del estado Aragua. La finca fue seleccionada por mostrar actividad serológica contra el serovar en estudio.

**Población:** La población estuvo compuesta por un rebaño de 80 vientres de raza mestiza Holstein, donde se detectó por primera vez actividad serológica contra *Leptospira* en noviembre de 1996. Igualmente hubo manifestaciones clínicas como abortos, nacimiento de becerros no a término, nacimiento de becerros débiles y disminución de la producción de leche.

**Detección de anticuerpos séricos contra *Leptospira interrogans*:** El tamaño de la muestra se determinó realizando pruebas serológicas a todas las vacas adultas en producción (42 en total), tomando como muestra aquellas que presentaron anticuerpos séricos contra el serovar georgia. De ese análisis, sólo 16 vacas (n=16) presentaron anticuerpos contra ese serovar. Se tomó como título mínimo reaccionante 1/100. La técnica

serológica de diagnóstico utilizada para ésta fase fue la Aglutinación Microscópica (MicroAglutination Test, MAT) (Myers, 1985). Las muestras de sangre para serología se recolectaron en tubos al vacío estériles sin anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson), con agujas Vacutainer® estériles.

**Aislamiento y cultivo de cepas de campo:** Las muestras que se utilizaron de los animales en estudio (n=16) para el aislamiento de *Leptospiras*, consistieron en muestras de sangre con anticoagulante (EDTA-K) y muestras de orina recolectadas en agosto de 1998. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos al vacío estériles con anticoagulante (Vacutainer®) y se sembraron en un medio de transporte para *Leptospira* que contenía 4 ml de solución salina estéril amortiguada con fosfatos (SSAF) y 1 ml de 5-Fluoracilo para ser transportadas al laboratorio. Las muestras de orina se recolectaron en envases estériles, previa inyección intramuscular de un agente diurético a cada animal (Furosemida, UROVAL®, Laboratorios Velvaca) a razón de 5mg/KgPV, según la técnica de Nervig y Garret, 1979 (Leonard *et al.*, 1992a; Leonard *et al.*, 1992b; McClintock *et al.*, 1993; Abdollahpour *et al.*, 1996). De cada muestra de orina se sembró 1 ml en un medio de transporte constituido por 4 ml de SSAF y 1 ml de 5-Fluoracilo (Myers, 1985). Tanto las muestras de sangre como de orina se sembraron en medios de cultivo de Fletcher y medio EMJH (Tween 80) en diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Los cultivos se revisaron cada 15 días por 3 meses. El aislado se sometió a una identificación preliminar a nivel de serogrupo, probándolo frente a una batería de sueros hiperinmunes mediante la técnica MAT (Myers, 1985); los sueros

utilizados fueron: pyrogenes, ballum, castelloni, australis, autumnalis, tarassovi, hardjo, bataviae, icterohaemorrhagiae, pomona, paidjan, sejroe, wolffi y grippotyphosa. El serogrupo sejroe es antigénicamente compatible con el serogrupo mini al cual pertenece el serovar georgia (Thiermann *et al.*, 1986). Para su clasificación a nivel de serovar se envió al Laboratorio Royal Tropical Institute, en Holanda.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 42 muestras de sangre de las vacas en producción arrojaron los siguientes resultados (Tabla 1): de las 42 muestras analizadas, 6 vacas (14,28%) reaccionaron al serovar pomona con títulos 1/100; 10 vacas (23,8%) con títulos 1/200 y 1 vaca (2,38%) con títulos 1/400, para un total de 17 vacas (40,47%) reaccionantes al serovar. Para el serovar grippotyphosa, de las 42 muestras analizadas, 9 vacas (21,42%) reaccionaron con títulos 1/100 y 1 vaca (2,38%) con títulos 1/200, para un total

de 10 vacas (23,8%) reaccionantes al serovar. En el caso del serovar hardjo, reaccionaron 2 vacas (4,76%) con títulos 1/100 y 2 vacas (4,76%) con títulos 1/200, para un total de 4 vacas (9,52%) reaccionantes al serovar. Para el serovar georgia, de las 42 muestras, reaccionaron 4 vacas (9,52%) con títulos 1/100; 4 vacas (9,52%) con títulos 1/200; 2 vacas (4,76%) con títulos 1/400; 1 vaca (2,38%) con títulos 1/800 y 5 vacas (11,9%) con títulos 1/1600, para un total de 16 vacas (38,09%) reaccionantes al serovar.

Se procedió a seleccionar los animales cuyos sueros presentaron títulos contra el serovar georgia, según lo expresado en la Tabla 2. Los resultados del estudio serológico en los animales seleccionados para la investigación indican que 5 vacas de las 16 seleccionadas (31,25%) presentaron títulos de anticuerpos contra otros serovares además de georgia (4 vacas reaccionaron solamente a pomona y 1 vaca reaccionó a grippotyphosa). Las otras 11 vacas (68,75%) sólo presentaron títulos contra el serovar georgia. Esto

Tabla 1. Títulos de anticuerpos iniciales obtenidos por MAT

Títulos de Anticuerpos	Numero y porcentaje de vacas reaccionantes por serovar			
	pomona	grippytyphosa	hardjo	georgia
1/100	6 (14,28%)	9 (21,42%)	2 (4,76%)	4 (9,52%)
1/200	10 (23,8%)	1 (2,38%)	2 (4,76%)	4 (9,52%)
1/400	1 (2,38%)	-	-	2 (4,76%)
1/800	-	-	-	1 (2,38%)
1/1600	-	-	-	5 (11,9%)
Total	17 (40,47%)	10 (23,8%)	4 (9,52%)	16 (38,09%)

Tabla 2. Títulos de anticuerpos contra serovar georgia obtenidos en las muestras seleccionadas por MAT

Títulos contra georgia	Sueros (vacas)	Total sueros reaccionantes por título
1/100	7,9,10,41	4
1/200	11,25,36,40	4
1/400	32,38	2
1/800	35	1
1/1600	1,2,8,14,15	5
Total sueros reaccionantes a georgia		16

indica que los animales pueden haber estado infectados simultáneamente por más de un serovar y presentar anticuerpos contra varios serovares; incluso, pueden excretar por orina varios serovares al mismo tiempo (Ellis *et al.*, 1982; Abdollahpour *et al.*, 1996).

Los medios de cultivo inoculados con las muestras de sangre, no presentaron crecimiento bacteriano correspondiente al género en estudio. La explicación de éstos resultados pueden ser variables. La causa mas probable de que no se lograra aislamiento en las muestras de sangre recolectadas, se basa en el hecho de que es posible que ninguna de las vacas seleccionadas para la investigación se encontraran en fase de leptospiremia. Además, los anticuerpos aglutinantes IgM ó IgG se hacen detectables en sangre entre los 7 y 14 días postinfección (Leonard *et al.*, 1993). Si todas las vacas presentaron títulos mínimos de 1/100 indica que tenían al menos 10 a 14 días de infectadas y en ese período ya las *Leptospiras* han pasado al riñón. Sin embargo, Hataway *et al.* (1983), afirmaron que si el foco de infección endémico se mantiene, pueden ocurrir reinfecciones en la población,

principalmente durante estados de inmunosupresión como la gestación y provocar nuevamente la fase clínica de la enfermedad aunque los anticuerpos hayan caído a 1/100.

En los medios de cultivo de Fletcher inoculados con las muestras de orina, se obtuvo crecimiento bacteriano de *Leptospira* en dos de las muestras (vacas 11 y 14) a la dilución de  $10^{-1}$ . En el resto de las muestras no se obtuvo crecimiento del agente. Esto puede obedecer a varios factores. Una razón pudo haber sido que las infecciones fueron esporádicas y no existió una infección clínica importante como para lograr el aislamiento de la bacteria (Ellis *et al.*, 1982; Mc Clintock *et al.*, 1993). También es posible que la toma de la muestra de orina no coincidiera con la excreción del agente por la misma debido al comportamiento del microorganismo de excretarse en forma intermitente (Hataway y Little, 1983; Leonard *et al.*, 1992<sup>a</sup>; Leonard *et al.*, 1993). Otra razón por la que pudo haber fallado el aislamiento, es la duración del período de leptospiruria en los animales seleccionados, ya que en las infecciones naturales es difícil determinar en qué etapa de la enfermedad se encuentran los animales (Leonard *et al.*, 1992<sup>b</sup>; Leonard *et al.*, 1993). El aislamiento de *Leptospira* en la orina puede verse afectado por factores como sensibilidad del medio de cultivo empleado y la manipulación del material durante el procesamiento (Feresu, 1992).

En las Tablas 3 y 4 se observan los resultados obtenidos para la seroidentificación de los aislados en las vacas 11 y 14 a nivel de serogrupos y a nivel de serovar. La identificación de los aislados de las vacas 11 y 14 como *Leptospira interrogans* serovar pomona (Tabla 4) indica que la serología no se correspondió con la bacteriología. Una de

Tabla 3. Seroidentificación de los aislados en vacas 11 y 14 por MAT, a nivel de serogrupos

Antisuero utilizado	Títulos de anticuerpos por MAT	
	VACA 11	VACA 14
Autumnalis	1/100	-
Hardjo	1/6400	1/1600
Pomona	1/6400	1/3200
Sejroe (1)	1/12800	1/25600

(1): Se utilizó el suero hiperinmune de sejroe como referencia para georgia.

Tabla 4. Seroidentificación de los aislados en las vacas 11 y 14 por la técnica MAT con Anticuerpos Monoclonales y Absorción-aglutinación Cruzadas, a nivel de serovar

Aislados	Resultados
Cultivo # 11	<i>Leptospira interrogans</i> serovar pomona
Cultivo # 14	<i>Leptospira interrogans</i> serovar pomona

las razones que puede explicar este hecho es que hubo más de un serovar infectando a los animales (georgia y grippotyphosa en la vaca N° 11 y georgia en la vaca N° 14) de manera que el serovar que se excretó en el momento de la toma de la muestra no correspondió con el serovar que produjo los mayores títulos de anticuerpos en sangre (reacción paradójica) (Hartskeerl *et al.*, 2000).

Abdollahpour *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares en Australia, donde inocularon novillas vía intraocular con orina que contenía serovar hardjo y posteriormente recuperaron de

orina los serovares hardjo y grippotyphosa; siendo los títulos contra el serovar hardjo más altos que contra el serovar grippotyphosa.

Ellis *et al.* (1981), realizando estudios epidemiológicos en Irlanda, demostraron que la presencia de anticuerpos aglutinantes en sangre no son indicativos de la presencia de *Leptospira* en los riñones. Mc Clintock *et al.* (1993), observaron en casos de Leptospirosis humana que el serovar detectado en cultivos de sangre difería del serovar que provoca los mayores títulos de anticuerpos aglutinantes, y en estudios serológicos posteriores los títulos de anticuerpos contra el serovar aislado se incrementaron, atribuyéndose esto a una respuesta anamnésica provocada por una infección previa del serovar aislado.

La duración de la fase de leptospiruria en animales infectados naturalmente no puede determinarse con exactitud pues se desconoce el momento de la infección (Ellis *et al.*, 1981). Sin embargo, se ha demostrado que los animales pueden excretar leptospiras por orina por más de un año (Leonard *et al.*, 1992b). En este trabajo se aisló pomona y no georgia aún

cuando los niveles de anticuerpos contra georgia eran elevados. Es probable que la fase de leptospiruria había cesado o declinado tan marcadamente que fue imposible recuperar organismos en la orina.

La *Leptospira* presenta un antígeno que promueve la formación de anticuerpos (LPS) y se considera altamente antigénico (Farrelly et al., 1987; Jost et al., 1986; Chapman et al., 1988; Jost et al., 1989). Las variaciones cuantitativas y cualitativas en los epitopes del LPS pueden tener influencia en la clasificación serológica de las leptospiras aún cuando se utilicen anticuerpos monoclonales (Adler et al., 1989; Vinh et al., 1994). Por lo tanto, cuando se considere la especificidad antigénica de las leptospiras se debe tener en cuenta que no hay antígenos diferentes para cada serovar, sino un mosaico de epitopes de diferentes especificidades que pueden encontrarse en el mismo antígeno (Adler et al., 1989). En algunos casos se producen anticuerpos serovar-específicos (Adler et al., 1989), pero en general, las aglutininas reaccionan con serovares heterólogos dentro y no fuera del mismo serogrupo (Farrelly et al., 1987; Jost et al., 1986), aunque puede existir reacción cruzada entre serogrupos (Hartskeerl et al., 2000), lo que explicaría el resultado de la clasificación de los aislados del presente trabajo a nivel de serogrupos, los cuales reaccionaron a 3 serogrupos (hardjo, pomona y sejroe).

Finalmente, los humanos y animales pueden infectarse accidentalmente con un serovar del cual no son hospederos comunes, considerándose entonces como hospederos accidentales (Mc Clintock et al., 1993; Hartskeerl et al., 2000). Otro factor que pudo impedir el aislamiento del serovar georgia, es que los bovinos se estén comportando como hospederos accidentales del mismo.

## CONCLUSIONES

Los bovinos presentaron anticuerpos contra más de un serovar de *Leptospira interrogans*. Para lograr el aislamiento del género *Leptospira* en muestras de sangre de bovino, el animal debe encontrarse en la fase de leptospiremia. Los bovinos que presentan títulos de anticuerpos contra *Leptospira* 1/100 o mayores, probablemente se encuentran en la fase de leptospiruria. Existe un foco de infección de leptospiras en el área de estudio que permite a los animales reinfectarse y sufrir la fase subclínica de la enfermedad por presentar títulos de anticuerpos séricos de 1/100. No fue posible determinar el tiempo de leptospiruria durante el cual los animales excretaron microorganismos a través de la orina por desconocerse el momento de la infección. Se aisló el serovar pomona, lo cual indica que la serología no se correspondió con la bacteriología. La presencia de anticuerpos en sangre contra un serovar de leptospira no es indicativo de la presencia del mismo en los riñones. En una infección por *Leptospira* se producen anticuerpos serovar-específicos en algunos casos, pero en general, se producen aglutininas que reaccionan con varios serovares dentro del mismo serogrupo (aglutinación cruzada). Los bovinos de este estudio se pudieran estar comportando como hospederos accidentales del serovar georgia, o también, dicho serovar pudiera estar adaptándose a la especie bovina, según los altos títulos de anticuerpos obtenidos en dichos animales.

## RECOMENDACIONES

Utilizar varios tipos de medios de cultivo selectivos para *Leptospira* pues es un agente de crecimiento lento y



susceptible a muerte por contaminación de los medios. Continuar realizando muestreos de orina y sangre en bovinos que presenten títulos contra el serovar georgia. Hacer estudios epidemiológicos en la zona que permitan conocer la fuente de infección del serovar georgia en el área de estudio. Hacer estudios de potencia de la vacuna contra leptospirosis o bien de la respuesta inmunológica de los animales a la vacuna, pues los animales estaban vacunados con una bacterina que contenía el serovar pomona y es evidente que no produjo buena protección pues se logró aislar en las muestras de orina.

#### AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración de las siguientes instituciones: Instituto de Investigaciones Veterinarias, IIV (FONAIAP-INIA) por el procesamiento de las muestras; Royal Tropical Institute (KIT) en Holanda por la tipificación final de los aislados; Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por la subvención parcial del proyecto. Asimismo, se le agradece a los propietarios de Vaquera San Vicente donde se realizó la investigación y a todas las personas involucradas en su desarrollo que de alguna manera hicieron posible este trabajo.

#### REFERENCIAS

- Abdollahpour, G.; English, A.W. y Tasler, J. 1996. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa from a heifer in New South Wales. *Aus Vet J.* 73:109-110.
- Adler, B.; Ballard, S.A.; Miller, S.J. y Faine, S. 1989. Monoclonal antibodies reacting with serogroup and serovar specific epitopes on different lipopolysaccharide subunits of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Microbiol Im.* 47:213-218.
- Benner, D.J.; Kaufmann, A.F.; Sulzer, K.R.; Steigerwalt, A.G.; Rogers, F. y Weyant, R.S. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacterial* 49:839-858.
- Biberstein, E. y Chung, Y. 1994. "Tratado de Microbiología Veterinaria". Editorial Acribia. España. pp 267-273.
- Chapman, A.J.; Adler, B. y Faine, S. 1988. Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Med. Microbiol.* 25:269-278.
- Contreras, J.A. 1992. Enfermedades de los Bovinos. Enfermedades causadas por bacterias. Editora Rapidit. Lara, Venezuela. pp. 435-448.
- Ellis, W.A. 1986. Effects of leptospirosis on bovine reproduction. En: *Current Therapy in Theriogenology 2*. Morrow, D. Ed. Saunders. USA. pp. 267-271.
- Ellis, W.A.; O'brien, J.J. y Cassells, J. 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 108:555-557.
- Ellis, W.A.; O'brien, J.J.; Neill, S.D. y Hanna, J. 1982. Bovine leptospirosis:

- serological findings in aborting cows. *Vét Rec.* 110:178-180.
- Everard, C.; Sulzer, C.; Bhagwandin, L.; Fraser-Chanpong, G. y James, A. 1980. Pathogenic *Leptospira* isolates from the caribbean islands of Trinidad, Grenada and St. Vincent. *Int. J. Zoo.* 7:90-100.
- Farrelly, H.E.; Adler, B. y Faine, S. 1987. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Med. Microbiol.* 23:1-7.
- Feresu, S.B. 1992. Isolation of *Leptospira interrogans* from kidneys of Zimbabwe beef cattle. *Vét. Rec.* 130:446-448.
- Galton, M.; Gorman, G. y Shotts, E. 1960. A new leptospiral subserotype in the Hebdomadis group. *Pub. Hlth. Rep.* 75:917-921.
- Hartskeerl, R.A.; Smits, H.L.; Korver, H.; Goris, M.G. y Terpstra, W.J. 2000. International Course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Royal Tropical Institute, Department of Biomedical Research. Amsterdam, Holanda.
- Hataway, S.C. y Little, W.A. 1983. Epidemiological study of *Leptospira* hardjo infection in second calf dairy cows. *Vét. Rec.* 112:215-218.
- Heath, S. y Johnson, R. 1994. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205:1518-1523.
- Jost, B.H.; Adler, B.; Vihn, T. y Faine, S. 1986. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 22:269-275.
- Leonard, F.C.; Quinn, W.A. y Ellis, K. 1992a. Possible effect of pH on the survival of leptospires in cattle urine. *Vét. Rec.* 131:53-54.
- Leonard, F.C.; Quinn, W.A. y Ellis, K. 1992b. Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vét. Rec.* 131:435-439.
- Leonard, F.C.; Quinn, P.J. y Ellis, W.A. 1993. Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. *Res in Vet Sci* 55:195-202.
- Lugo, A. 1996. Epidemiología de la Leptospirosis. *Memorias del I Taller Regional sobre leptospirosis bovina.* Sur del Lago. Venezuela.
- Mc Clintock, C.S.; Mc Gowan, M.R.; Corney, B.J.; Colley, J.; Smithe, L.; Dohnt, M. y Woodrow, M. 1993. Isolation of *Leptospira interrogans* serovars hardjo and zannoni from dairy herd in north Queensland. *Aus Vet J.* 70:393-394.
- Merchant, I. y Packer, R. 1980. Bacteriología y Virología veterinarias. Tercera edición. Editorial Acribia. España. pp. 503-513.
- Myers, D. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. *Centro Panamericano de Zoonosis.* Nota Técnica N° 30. OPS, OMS.
- Nervig, R.M. y Garret, L.A. 1979. Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am J Vet Res.* 40:1197.
- Perolat, P.; Chappel, R.J.; Adler, B.; Baranton, G.; Bulach, D.M.; Billinghamurst, M.L.; Letocart, M.; Merien, F. y Serrano, M.S. 1998. *Leptospira fanei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Sist Bacteriol* 48:851-858.

- Prescott, J. 1993. Leptospirosis. En: *Current Veterinary Therapy 3*. Howard, J.L. Editorial Saunders. USA. pp. 541-546.
- Thiermann, A.B.; Handsaker, A.L.; Foley, J.W.; White, F.H. y Kingstote, B.F. 1986. Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe by restriction endonuclease analysis. *Am J Vet Res.* 47:61-66.
- Vihn, T., Faine, S., Handley, C.J., Adler, B. 1994. Immunochemical studies of opsonic epitopes of the lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Immunol and Med Microbiol.* 8:99-108.
- Woodward, M. y Redstone, J. 1994. Deoxynucleotide sequence conservation of endoflagelin subunit protein gene, *flaB*, within the genus *Leptospira*. *Vet Microbiol.* 239-251.